

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461709

研究課題名(和文) IL-33のケラチノサイト細胞内における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of IL-33 expressed in nucleus of normal human epidermal keratinocyte

研究代表者

津田 英利 (Tsuda, Hidetoshi)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：30414923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：表皮角化細胞の核内に発現するIL-33をsiRNAによってノックダウン(KD)した時、細胞への影響を行った検討した。IL-33をKDすると細胞増殖が抑制され、DNAの合成能が抑制される事が解った。一方、ミトコンドリアの活性は変わらなかった。細胞周期の検討を行った結果、KD細胞ではG2/M期の細胞が増えおり、2核の細胞集団が増える事が明らかになった。この現象は、IL-33のKDにより、RhoAの活性化に必須な酵素であるEct2の発現が減少する。その為活性型のGTP-RhoAの量が減り、アクチン重合及びミオシンL鎖のリン酸化が減弱し、細胞収縮環の機能が低下するためであることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：IL-33 is expressed in the nucleus of epithelial and endothelial cells. In this study, it was investigated that the effect of IL-33 knockdown (KD) with siRNA in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs). IL-33 KD attenuated BrdU uptake. The cell cycle analysis found that the number of cells in G2/M phase was increased in IL-33 KD cells. Immunofluorescence study revealed that there were many binucleated cells in IL33 KD cell culture, which were scarcely found in control cells. Western blot analysis revealed that IL-33 KD cells showed attenuated myosin light chain phosphorylation, which was reported to associate with contractile ring formation. Reduced expression of Ect2 was observed, which would have caused reduced activation of RhoA. These results suggest that nuclear IL-33 is positively involved in cell proliferation through promoting contractile ring formation by positively regulating myosin light chain phosphorylation, expression of Ect2, and activation of RhoA in NHEKs.

研究分野：皮膚科学 分子生物学 細胞生物学 遺伝学

キーワード：IL-33 細胞周期 細胞分裂 細胞収縮環 表皮角化細胞 siRNA

1. 研究開始当初の背景

IL-33は新規のIL-1ファミリーのサイトカインであり、発見当初は、内皮細胞の核内タンパク質として報告された。その為NF-HEV(nuclear factor from high endothelial venule)と呼ばれていた。IL-33は細胞外に出ることによってサイトカインとして機能し、Th2タイプのサイトカインであるIL-4やIL-13の産生を促し、炎症を悪化させる因子とされる。また細胞外に放出されるためには外的刺激によるネクロシスを伴うため、デインジャーシグナルの一つである「alarmin」の一種としても分類されている。サイトカインとしては喘息の悪性因子であるという報告が多くなされ、その後鼻炎や春季カタルという鼻や目の炎症性疾患においても重要な役割をすることが報告されている。皮膚疾患においても、アトピー性皮膚炎や乾癬といった疾患において、血清中濃度が上昇するという報告があり、これらの疾患の重症度と相関があるとされている。また、炎症局所の表皮細胞において、IL-33陽性の細胞が多く見られることが、免疫組織学的検討においても明らかとなっている。一方では、核内に発現するIL-33は、HistonH2Aと相互作用するとされており、クロマチン構造と結合している事が考えられる。その中で、細胞内においては、転写因子の一つである、NFκBと相互作用することにより、NFκBの働きを負に制御するという報告が複数のチームよりされた。一方で正に制御するとの報告もあり、核内での働きについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

サイトカインとしてのIL-33の機能は良く調べられており、報告も多いが、細胞内での働きについては転写因子NFκBと相互作用するという報告が数件見られるのみで、まだ詳細な機能は明らかにされていない。そこで、IL-33を恒常的に発現する細胞である、正常表皮ヒト角化細胞を用いて、細胞内のIL-33を機能的に抑制することにより、表皮角化細胞にどのような影響が出るか否か、検討を行い、IL-33の細胞内機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

初代細胞株である、正常表皮ヒト角化細胞(Normal Human Epidermal Keratinocytes, NHEKs)を用い、デザイン済みのIL-33 siRNAオリゴ(Invitrogen)を用いて細胞内のIL-33をロックダウン(KD)した。コントロールとしてはIL-33のsiRNAと同様のGC含量を持つscramble siRNAを用いた。細胞は1-2回継代した若いものを用い、Lipofectamin RNAiMAX(Invitrogen)を用いて、細胞へトランスフェクションした。

トランスフェクション後24時間、48時間、72時間で細胞を回収し各実験に用いた。RNA分析用にはTRIzol(Ambion)を用い、タンパク質解析用にはRIPA bufferを用いて回収した。抽出したRNAはReverTra Ace(TOYOBO)によりcDNAへ逆転写を行い、real-time PCR(Applied Biosystems)によって、IL-33、Ect2、RhoAのそれぞれの発現量について、比較を行った。タンパク質はSDS-PAGEにて分離後、PVDF膜に転写し、IL-33、RhoA、Ect2、リン酸化ミオシンL鎖の検出を行った。細胞のproliferation解析は、MTTアッセイとBrdUアッセイを用いて評価した。同時に、アポトーシスの有無を確認するために、AnnexinVとMitoTrackerによって染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行った。細胞周期については、KDした細胞とコントロール細胞をPIにて染色しBD LSRFortessaによって測定を行い、得られたデータはFlow Joeにより解析を行った。RhoAの活性については、GTP型とGDP型を検出して、その量比によって評価を行った。細胞分裂の様子については、Keyence BZ-9000のステージ上に培養チャンバーを設置し、タイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

siRNAによりNHEKにおけるIL-33の発現をRNAレベル、タンパク質レベル共に効率的にロックダウン(KD)することが出来た(図1)。この細胞を顕微鏡にて観察した

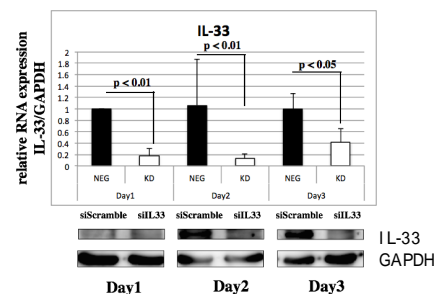


図1 siRNAを用いたNHEKsにおけるIL-33のロックダウン効率

際に、IL-33KD細胞において、コントロールと比較して細胞数が少ない様に思われたため、cell proliferation assayによって細胞増殖能を検討した。MTTアッセイをBrdUアッセイの2つにより評価を行った結果、MTTアッセイではKD2日目に、KD細胞において低値を示したが、BrdUアッセイにおいては、

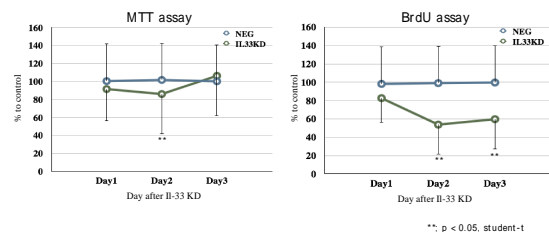


図2 IL-33KD細胞におけるMTTアッセイとBrdUアッセイによる細胞増殖能の比較

2 日目、3 日目と続けて有意に低値を示した(図2)。このことは、細胞の「生き」自体はさほど影響を受けず、DNA の合成能が落ちていると考えられた。FACS による細胞周期の検討の結果、IL-33KD 細胞では4n 期の細胞、すなわち G2/M 期の細胞が増えていることが解った。MTT アッセイ及び、BrdU アッセイの結果を裏付けるため、AnnexinV による染色を行った結果、IL-33KD 細胞ではアポトーシスが増えている証拠は得られなかった。しかし、この時、IL-33KD 細胞において、1 個の細胞に 2 個の核を多く見ることが出来た。このことは、FACS で得られた 4n 細胞が増えていることと矛盾しておらず、IL-33KD の影響により、細胞が 2 つに別れる

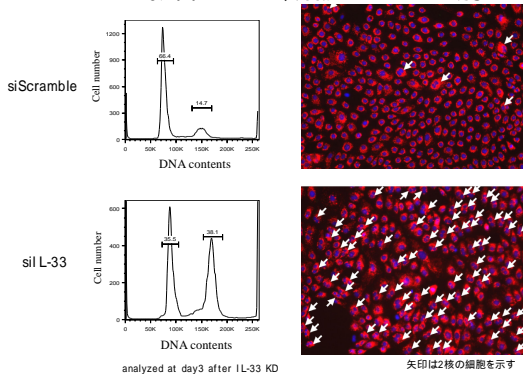


図3 IL-33KDによる細胞周期への影響と2核化

現象、すなわち細胞質分裂に異常が起きていることが考えられた(図3)。

細胞質分裂に重要な働きをする構造に細胞収縮環があるが、これを正常に機能させるためにはアクチンの重合とミオシンL鎖のリン酸化が必要である。そこで、ミオシンL鎖のリン酸化をウエスタンブロット法により検討した結果、IL-33KD 細胞で減弱していることが解った。このミオシンL鎖のリン酸化に必要な RhoA の発現量を比較したところ、RNA、タンパク質レベルいずれにおいても差は見られなかった。RhoA は GDP 型から GTP 型になることによって活性化することが知られている。そこで、IL-33KD 細胞の GDP/GTP RhoA の比率を調べたところ、コントロール細胞に比べ、GTP 型 RhoA が減少していることが解った。RhoA の GDP-GTP 型のコンバートには Ect2 という酵素が重要な役割を果たしているが、IL-33KD 細胞においては、RNA 及びタンパク質レベルにてコ

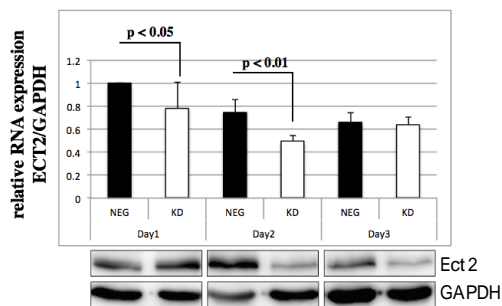


図4 IL-33KDによるEct2発現の減少

ントロール細胞よりも発現量が低下していた(図4)。細胞収縮環の機能不全により細胞質分裂が正常に行われていないことを証明するために、IL-33KD 細胞の細胞分裂の様子をタイムラプス撮影を行い観察した。その結果、IL-33KD 細胞では細胞質分裂時のくびれが形成されるのが遅れ、さらに完全に切れることなく再びくびれがなくなり一つの細胞になることが観察できた。

これらのことより、IL-33 は正常表皮ヒト角化細胞内において、細胞分裂時に必要な Ect2 の発現を直接もしくは間接的に調節することによって細胞収縮環の形成を促進し、細胞質分裂に正に関与している事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Meephansan J., Komine M., Tsuda H., Karakawa M., Tominaga S., Ohtsuki M. Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. J Dermatol Sci 2013 (71) 107-104

KarakawaM., Komine M., Hanekawa Y., Tsuda H., Sayama K., Tamaki K., Ohtsuki M. CCL27 is down regulated by Interferon gamma via epidermal growth factor receptor in normal human epidermal keratinocyte. J Cell Physiol 2014 (229) 12 1935-1945

Tominaga S., Tago K., Tsuda H., Komine M. Dual function of IL-33 on proliferation of NIH3T3 cells. Cytokine (2015) 72 105-108

Fujita E., Komine M., Tsuda H., Adachi A., Murata S., Kamata Y., Minota S., Ohtsuki M. Case of H syndrome with massive skin involvement, retroperitoneal fibrosis and Raynaud's phenomenon with mutation in the SLC29A3 gene. J Dermatol (2015) 42 421-423

〔学会発表〕(計 13 件)

津田英利・小宮根真弓・大塩智之・富永眞一・大槻マミ太郎 IL-33 ノックダウンにより正常ヒト表皮角化細胞の細胞周期は G1/S から G2/M 期へシフトする 第 20 回分子皮膚科学フォーラム 2013 年 4 月 12-13 日 浅草・東京

Tsuda H., Komine M. Oshio T., Tominaga S., Ohtsuki M. IL-33 as a nuclear protein to affect proliferation and differentiation of normal human epidermal keratinocytes. International

Investigative Dermatology 2013 年 5 月
8-11 日 Edinburgh, Scotland

津田英利・小宮根真弓・大塩智之・富永眞一・大槻マミ太郎 ケラチノサイトにおけるヒト IL-33 プロモーター領域の解析 第 37 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸ポートアイランドホテル他・兵庫

津田英利・小宮根真弓・大塩智之・富永眞一・大槻マミ太郎 表皮角化細胞における IL-33 発現調節機構の探索 第 21 回分子皮膚科学フォーラム 2014 年 4 月 11-12 日 京都

Tsuda H., Komine M., Oshio T., Tominaga S., Ohtsuki M. Identification of the promoter region in human IL-33 gene, and analysis of its regulation in keratinocytes, endothelial cells and fibroblasts. 73rd Annual Meeting of Society for Investigative Dermatology 2014 年 5 月 7-10 日 Albuquerque, USA

Tsuda H., Komine M., Oshio T., Tominaga S., Ohtsuki M. Regulation of IL-33 expression by normal human epidermal keratinocyte. 44th Annual meeting of European Society for Dermatological Research 2014 年 9 月 10-13 日 Copenhagen, Denmark

Tsuda H., Komine M., Oshio T., Tominaga S., Ohtsuki M. Nuclear IL-33 regulates cell proliferation of keratinocyte via control of cytokine. 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25-27 日 パシフィコ横浜、神奈川

Tsuda H., Komine M., Oshio T., Tominaga S., Ohtsuki M. knockdown of nuclear IL-33 suppressed proliferation of keratinocytes through inhibition cytokinesis. The 39th Annual meeting of the Japanese Society of Investigative dermatology. 2014 年 12 月 12-14 日 吹田、大阪

津田英利・小宮根真弓・富永眞一・大槻マミ太郎 IL-33 は正常ヒト表皮角化細胞内で細胞質分裂に関与している 第 22 回分子皮膚科学フォーラム 2015 年 4 月 17-18 日 ホテル日航高知旭ロイヤル、高知

Tsuda H., Komine M., Tominaga S., Ohtsuki M. Nuclear IL-33 is involved in cell proliferation via formation of contractile ring in normal human epidermal keratinocyte. 74rd Annual Meeting of Society for Investigative

Dermatology 2015 年 5 月 6-9 日
HILTON ATLANTA, ATLANTA, USA

Tsuda H., Komine M., Tominaga S., Ohtsuki M. Oncostatin M induces IL-33 through STAT3 pathway in normal human epidermal keratinocyte. 45th Annual meeting of European Society for Dermatological Research 2015 年 9 月 9-12 日 Postillion Convention Center-WTC ロッテルダム、オランダ

Oshio T., Komine M., Tsuda H., Tominaga S., Sato H., Nakae S., Ohtsuki M. Nuclear expression of IL-33 in skin is positively involved in wound healing in mice. 45th Annual meeting of European Society for Dermatological Research 2015 年 9 月 9-12 日 Postillion Convention Center-WTC ロッテルダム、オランダ

津田英利・小宮根真弓・富永眞一・大槻マミ太郎 IL-33 は表皮角化細胞内で細胞分裂に関与している 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1-4 日 神戸ポートアイランド、神戸、兵庫

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 英利 (TSUDA HIDETOSHI)

自治医科大学・医学部・ポスドクター
研究者番号：30414923

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：